

PAT-NO: JP408035155A
**DOCUMENT-
IDENTIFIER:** JP 08035155 A
TITLE: MATERIAL FOR REINFORCING MICROORGANISM-IMMOBILIZING CARRIER

PUBN-DATE: February 6, 1996

INVENTOR-INFORMATION:

NAME	COUNTRY
IGUCHI, MASATOSHI	
MIHASHI, SHIGENOBU	
ICHIMURA, KUNIHIRO	
YAMANAKA, SHIGERU	
WATABE, OTOHIKO	
NISHI, MIO	
URYU, MASARU	

ASSIGNEE-INFORMATION:

NAME	COUNTRY
AGENCY OF IND SCIENCE & TECHNOL	N/A
AJINOMOTO CO INC	N/A
SONY CORP	N/A

APPL-NO: JP07098542

APPL-DATE: April 24, 1995

INT-CL D04H001/42 , A61L015/00 , C08J005/04 , C08L001/00 , D01F002/00 ,
(IPC): H01B003/48

ABSTRACT:

PURPOSE: To obtain the reinforcing material used for the microorganism- immobilizing carrier and comprising the bacterium cellulose of ribbon-like microfibrils and added to a carrier for immobilizing microorganisms to impart durability against stress destruction and deformation and a cell leakage- preventing property on usage to the carrier.

CONSTITUTION: A microorganism producing bacterium cellulose, such as Acetobacter aceti subspecies xylinum ATCC 10821, is cultured to form a gel-like membrane containing a bacterium cellulosic polysaccharide. The membrane is disintegrated and filtered with a pulp-disintegrating machine to obtain the paste of the bacterium cellulose comprising ribbon-like microfibrils. A gelatin used as the carrier of a microorganism is mixed with the above-described disintegration product, homogeneously dispersed and mixed with the microorganism, further mixed with transglutaminase, and subsequently subjected to the gelation of the gelatin to obtain the microorganism-immobilized gelatin gel reinforced with the bacterium cellulose.

COPYRIGHT: (C)1996,JPO

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平8-35155

(43)公開日 平成8年(1996)2月6日

(51)Int.Cl.*

識別記号 庁内整理番号

F I

技術表示箇所

D 0 4 H 1/42

F

A 6 1 L 15/00

C 0 8 J 5/04

C 0 8 L 1/00

L A S

D 0 1 F 2/00

Z

審査請求 有 発明の数1 O.L (全 18 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号

特願平7-98542

(62)分割の表示

特願昭61-85021の分割

(22)出願日

昭和61年(1986)4月15日

(71)出願人 000001144

工業技術院長

東京都千代田区霞が関1丁目3番1号

(71)出願人 000000066

味の素株式会社

東京都中央区京橋1丁目15番1号

(71)出願人 000002185

ソニー株式会社

東京都品川区北品川6丁目7番35号

(72)発明者 井口 正俊

茨城県新治郡桜村並木3丁目654棟

(74)復代理人 弁理士 田中 政浩 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 固定化担体補強材

(57)【要約】

【目的】 強度の向上、粘着の防止、菌体等の漏出防止機能を有する酵素、微生物等の固定化担体補強材を提供する。

【構成】 リボン状ミクロフィブリルよりなるバクテリーアセルロースよりなる固定化担体補強材。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 リボン状ミクロフィブリルよりなるバクテリアセルロースよりなる固定化担体補強材

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明はバクテリアの產生する特定のセルロースを含有せしめることにより得られる引張り強さ、耐伸縮性にすぐれた高弾性及び高強度の成形材料に関するものである。

【0002】 この成形材料は紙その他各種シートとして利用しうるほか、糸状あるいは各種立体成形物として利用することもできる。

【0003】

【従来の技術】 従来、バクテリアの產生するセルロースとしては、アセトバクター・キシリナム (*Acetobacter xylinum*) ATCC 23769が產生するシート状のものを医療用パッドに利用することが知られている(特開昭59-120159号公報)。

【0004】 一方、従来の成形材料には種々のものが知られており、セルロースについても纖維を糸状、シート状、各種立体成形物に利用したもののがセルロース誘導体を一旦溶解して加工したセロファン、セルロイドなどがある。また、合成高分子材料も各種開発されており、そのなかには分子鎖を一定方向に配列してその方向の力学強度を特に高めたものもある。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】 従来の各種植物由來のセルロース及びセルロース誘導体の力学的強度はさほど大きくなく、例えばシート状のセルロイドやセロファンの弾性率はせいぜい2~3 GPa程度であった。

【0006】 また、合成高分子材料のうち分子鎖が一定方向に配列したものには、一方向については金属や無機物と同等の弾性率を持つものもあるが、他の方向の弾性率が低いために高強度素材として用いるには自から用途が限定されていた。そのため、分子の配列に異方性がなく構造素材として強度的に秀れているものが求められているが、分子がランダムに配列しているような高分子物質では弾性率が低かった。合成高分子からなる成形材料で高性能のものとしては、ポリエチルフィルム、アラミドシート、ポリイミドフィルム等が知られているが、弾性率はたかだか4~7 GPa程度であった。

【0007】 バクテリアの產生するセルロースを利用したものとしては前述の例があるが、その利用は医療用パッドに限られており、高力学強度分野における素材として利用価値が高いことについては全く知られていないかった。

【0008】 本発明の目的は、従来の成形材料を越えた、引張り強さ、耐伸縮性にすぐれた高弾性及び高強度の成形材料を提供することにある。

【0009】 本発明の別の目的は、この高力学強度に加

2

えて親水性にすぐれかつ毒性上問題のない成形材料を提供することにある。

【0010】 本発明のまたさらに別の目的は強度の向上、粘着の防止、菌体等の漏出防止機能を有する酵素、微生物等の固定化担体に用いる高強度成形材料を提供することにある。

【0011】 本発明のさらに別の目的は、高力学強度に加えて導電性、磁性、高絶縁性、熱伝導性、耐候性、耐薬品性などを付与することにより各種利用分野においてすぐれた高力学強度素材を提供することにある。

【0012】

【課題を解決するための手段】 本発明者らはこれらの目的を達成するべく種々研究を行ない、微生物の產生するリボン状のミクロフィブリルよりなるセルロースが引張り強さ等の力学強度が極めて大きく、このバクテリアセルロースを含有せしめた素材を成形材料に用いることによって前記目的を達成しうることを見出し、この知見に基いて本発明を完成するに至った。

【0013】 すなわち、本発明は、リボン状ミクロフィブリルよりなるバクテリアセルロースを含有してなる高力学強度成形材料に関するものである。

【0014】 バクテリアセルロースは、第1図にその電子顕微鏡写真を示すように、幅100~500Å、厚さ10~200Å程度のリボン状ミクロフィブリルからなっている。一般にはゲルの形で得られ、その含水率は95% (w/v) 以上である。

【0015】 このセルロースはセルラーゼによって容易に分解され、グルコースを生成する。すなわち、本セルロースの0.1% (w/v) 懸濁液にセルラーゼ(E.C. 3,2,1,4)(天野製薬製)を0.5% (w/v) になると溶かし、0.1M酢酸緩衝液中で30°Cで24時間反応させた。その結果、本物質の一部が分解されることが観察され、上澄液をペーパークロマトグラフィーで展開したところグルコースのほかに少量のセロビオース、セロトリオース及びその他のセロオリゴ糖が検出された。このほかに少量のフラクトース、マンノース等が検出される場合もあった。

【0016】 すなわち、本発明のバクテリアセルロースはセルロース及びセルロースを主鎖としたヘテロ多糖を含むもの及び β -1,3, β -1,2等のグルカンを含むものである。ヘテロ多糖の場合のセルロース以外の構成成分はマンノース、フラクトース、ガラクトース、キシロース、アラビノース、ラムノース、グルクロン酸等の六炭糖、五炭糖及び有機酸等である。なお、これ等の多糖が単一物質である場合もあるし、2種以上の多糖が水素結合等により混在していてもよい。

【0017】 バクテリアセルロースは上記のようなものであればいかなるものであっても使用可能である。

【0018】 このようなバクテリアセルロースを產生する微生物は特に限定されないが、アセトバクター・アセ

50

3

チ・サブスピシス・キシリナム (*Acetobacter aceti* subsp. *xylinum*) ATCC 10821あるいは同バストウリアヌス (*A. pasteurianus*)、同ランセンス (*A. ranceus*)、サルシナ・ベントリクリ (*Sarcina ventriculi*)、バクテリウム・キシロイデス (*Bacterium xyloides*)、シュードモナス属細菌、アグロバクテリウム属細菌等でバクテリアセルロースを産生するものを利用することができます。

【0019】これらの微生物を培養してバクテリアセルロースを生成蓄積させる方法は細菌を培養する一般的な方法に従えばよい。すなわち、炭素源、窒素源、無機塩類、その他必要に応じてアミノ酸、ビタミン等の有機微量栄養素を含有する通常の栄養培地に微生物を接種し、静置又はゆるやかに通気攪拌を行なう。炭素源としては、グルコース、シュクロース、マルトース、澱粉加水分解物、糖蜜等が利用されるが、エタノール、酢酸、クエン酸等も単独あるいは上記の糖と併用して利用することができます。窒素源としては、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム等のアンモニウム塩、硝酸塩、尿素、ペプトン等の有機あるいは無機の窒素源が利用される。無機塩類としては、リン酸塩、マグネシウム塩、カルシウム塩、鉄塩、マンガン塩等が利用される。有機微量栄養素としては、アミノ酸、ビタミン、脂肪酸、核酸、さらにはこれらの栄養素を含むペプトン、カザミノ酸、酵母エキス、大豆蛋白加水分解物等が利用され、生育にアミノ酸等を要求する栄養要求性変異株を用いる場合には要求される栄養素をさらに補添する必要がある。

【0020】培養条件も通常でよく、pHを5ないし9そして温度を20ないし40°Cに制御しつつ1ないし30日間培養すれば表層にバクテリアセルロースがゲル状に蓄積される。

【0021】本発明で使用するバクテリアセルロースは微生物の培養物から単離された精製品のほか、用途に応じある程度不純物を含むものであっても良い。例えば培養液中の残糖、塩類、酵母エキス等が微生物セルロースに残留していてもさしつかえない。また、菌体がある程度含まれていても良い。

【0022】このゲルを取り出して必要により、水洗する。この水洗水には目的に応じて殺菌剤、前処理剤などの薬剤を添加することができる。

【0023】水洗後は乾燥あるいは他の混練物等と混練後乾燥して使用に供する。乾燥の方法は、どのような方法でもよいが、通常セルロースが分解しない温度範囲で行なうことが必要なのは言うまでもない。又、該セルロース性物質は表面に多数の水酸基を有する微細な纖維より成っているので、乾燥中に纖維が相互膠着することにより纖維状の形態が失なわれることがある。したがって、これを防止して微細な纖維状の形態を生かして使用

4

したい時は、凍結乾燥や臨界点乾燥等の方法を用いた方が望ましい。

【0024】バクテリアセルロースは引張り強度等の力学的強度を高めるためにミクロフィブリルがからみ合った構造にするのがよく、そのために例えば培養物から取り出したゲルを直角方向から加圧して圧搾することにより自由水の大部分を除去してから乾燥する方法は有効である。圧搾圧力は1~10kg/cm²程度が適当である。この圧搾によって乾燥後のセルロースは圧搾方向に応じて配向したものになる。また、圧力を加えながら一方向に延ばす操作、すなわち圧延操作を行なうことによって乾燥後のセルロースは圧搾方向に加えて圧延方向に対しても配向性を有するに至る。圧搾装置は市販の機種のなかから適宜選択して利用することができる。

【0025】一方、バクテリアセルロースを一旦離解することも力学的強度を高めるうえで有効である。離解は機械的な剪断力をを利用して行なえばよく、例えば回転式の離解機あるいはミキサー等で容易に離解できる。離解後に前記の圧搾を行なうことも有効である。

【0026】本発明の高力学強度成形材料は、シート状、糸状、布状、立体状など各種形状に成形することができる。

【0027】シート状にする場合には、バクテリアセルロースを必要により離解してから層状にし、これを必要により圧搾して乾燥すればよい。圧搾によって面配向したものが得られるほか、圧延を加えることによって面配向するとともにさらに一軸配向したシートを得ることができる。

【0028】離解及び/又は圧搾を終了したシートの乾燥は適当な支持体に固定して行なうことが望ましい。この支持体へ固定することによって面配向度がさらに高まり、力学的強度の大きなシートを得ることができる。支持体には例えば網状構造をもった板、ガラス板、金属板などを利用できる。乾燥温度はセルロースが分解されない範囲であればよく加熱乾燥法のほか凍結乾燥法も利用できる。

【0029】このようにして得られたシートは、第1図に示すように、ミクロフィブリルがランダムにからみ合った構造をしている。そして、X線回折像によると圧搾したものは面配向しており、圧延も加えたものは面配向と同時に一軸配向もしている。シートの弾性率は通常1.0~2.0GPa程度である。

【0030】シートの厚さは用途に応じて定められるが、通常1~500μm程度である。

【0031】シートには各種の添加剤を加えることができる。例えば、各種の高分子材料の溶液(水性又は非水性)、エマルジョン、ディスページョン、粉体、溶融物等を加えることにより、その添加物の特性に応じて、強度、耐候性、耐薬品性、耐水性、撓水性、静電防止性等の幾つかを付与することができる。アルミニウム、銅、

鉄、亜鉛などの金属又はカーボンを粉末状あるいは糸状で加えれば導電性及び熱伝導性を高めることができる。また、酸化チタン、酸化鉄、炭酸カルシウム、カオリソ、ベントナイト、ゼオライト、雲母、アルミナ等の無機質材料を加えればその種類に応じて耐熱性、絶縁性などを改善し、あるいは表面に平滑性を付与することができる。低分子有機質あるいは接着剤を加えることによって強度をさらに増すことができる。フタロシアニン、アゾ化合物、アイ、ベニハナなどの色素で着色してもよい。着色にはそのほか各種の塗料、染料、顔料を利用することができます。医薬品、殺菌剤を加えることによってメディカルシートとして利用することもできる。

【0032】これらの混練物、添加剤は97%以下で目的の物性が得られる適当な量が加えられる。これらの添加時期は問うところではなく、バクテリアセルロースゲルあるいはその離解物に加えてもよく、圧搾後に加えてもよく、また乾燥後に加えてもよい。さらに、培地中あるいは培養物に加えてもよい場合もある。添加方法も混合のほか含浸によってもよい。

【0033】このようなシートには他の物質の層を積層することもできる。積層物はシートの使用目的に応じて適宜選択される。前述の混練物あるいは添加物のなかから選択することもでき、例えば耐水性の付与のために各種高分子材料をコーティングすることができる。

【0034】紙として利用する場合には、バクテリアセルロースゲルを離解後抄紙して乾燥すればよく、それによって引張強度、耐伸縮性等にすぐれるとともに化学的に安定で吸水性、通気性にすぐれた高弾性及び高強度の紙を得ることができる。この場合、製紙に使用される通常の添加剤、処理剤等を利用することができ、また、前述の混練物、添加剤のなかから選択して加えることもできる。

【0035】近年、電気絶縁紙、耐熱紙、難燃紙等の要求が高まり、非セルロース繊維を使用した合成紙、無機紙等が作られるようになった。これらを湿式法で作ろうとする場合には、非セルロース繊維が水素結合を行わないため、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリアクリコニトリル、芳香族ポリアミド等の繊維の如くパルプ化された繊維が得られる場合を除いて、セルロースパルプを添加して抄紙を行なう必要がある。この場合には出来る限りパルプ量を少なくして絶縁性、耐熱性、難燃性を向上させることが要求される。しかし、一般に使用されている木材パルプを混抄する場合には、添加量は20~50%に達し、目的が充分に達せられない。しかるに、木材パルプの代りにバクテリアセルロースを用いることにセルロース量を大幅に減少させることができ、絶縁性、耐熱性、難燃性にすぐれた紙を得ることができた。従って本発明の高力学強度成形材料はこれらにも有効である。

【0036】また、光架橋性ポリビニルアルコールは從

来の光架橋性樹脂と比較して生物に対する親和性がよいといわれており、酵素、微生物等の固定化剤の用途がこれによりさらに向ふると考えられている。また、印刷の原板を製作するときに使用されるフォトレジストは、基板上に樹脂を塗り、これに印刷すべき図案等を投影して光架橋を起こさせて樹脂を硬化させ、未硬化樹脂を洗い流して印刷原板を製作するものであるが、水溶性であるこの光架橋性ポリビニルアルコールはフォトレジストにも従来の油溶性のものに比べて安価で洗浄が容易という利点を有しており、応用が期待されている。しかし、これらの場合に水によって光架橋性ポリビニルアルコールが膨潤し架橋構造が破壊されてしまうという問題があった。しかるにバクテリアセルロースを加えることによってこの膨潤を阻止することができる。

【0037】糸とする場合には、例えばバクテリアセルロースゲル又はその離解物を洗浄、乾燥した後、ジメチルアセトアミド／塩化リチウム系溶媒等に溶解し、溶解物を水又はアルコール類、ケトン類、ジオキサン、テトラヒドロフラン等のセルロースが不溶でセルロースの溶媒が可溶な凝固液を用いて紡糸すればよい。

【0038】布とする場合には、この糸を用いて常法により織り上げればよい。

【0039】立体物にする場合には、バクテリアセルロースに各種プラスチックを混練し、あるいはさらに積層することによって目的の成形品とする。これは例えば各種FRP製品あるいは炭素繊維製品などに代替しうるものである。

【0040】固定化担体としては従来、寒天、カラギナンアルギン酸、ゼラチン、コラーゲン、ポリアミノ酸、光架橋性樹脂、ポリアクリルアミド及び各種樹脂等が用いられ、ポリ塩化ビニリデン、ポリエステル等の網、繊維を補強材としてこれらの担体に混合することにより、強度の向上とか粘着の紡糸がはかられてきた。ところがこの固定化物においては、補強材により担体が大きくなつて単位面積当たりの表面積が減少し、担体内の基質拡散が阻害されたり、担体に固定化される酵素、生体由来物質、触媒、その他の反応性物質（以下「活性成分」という）の濃度が相対的に減少したりして反応速度や反応収率が低下するという問題があった。又、活性成分が固定化担体から漏出するために長期間あるいは繰り返し使用すると、次第に活性が低下していくという問題があり、従来のポリ塩化ビニリデン、ポリエステル等の補強材を加えても、活性成分の担体からの漏出を防ぐことは困難であった。従来の固定化担体の内、非常に弱いゲル、一例を挙げると光架橋性ポリビニルアルコールの6%水溶液を架橋させたものを固定化担体として用いる場合には、水によって膨潤が引き起こされる為に固定化担体が破壊されるという問題もあった。

【0041】これまでの固定化担体補強材に代えて、バクテリアセルロースをそのままの状態や、離解し、ある

いはこれらの物をさらして乾燥して用いることにより、上記の問題点を解決して従来にない高強度な固定化担体を得ることができる。

【0042】このような固定化担体を製造するには、次のような方法がある。基本的には、該バクテリアセルロースと、下記の固定化担体素材を混合してからゲル化、重合又は成形させればよい。又、必要に応じて、この混合時に固定化目的の活性成分と一緒に加えて固定化してもよいし、固定化担体を製造後活性成分を固定化してもよい。

【0043】担体素材としては、該バクテリアセルロースと混合可能なものであれば特に限定されないが、例えば以下のようなものを利用できる。アガロース、デキストラン、セルロース、セルロース誘導体、アルギン酸、アルギン酸塩、キチン、キトサン、コラーゲン、アルブミン、アミノ酸ポリマー、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、タンニン、シリコンゴム、カゼイン、寒天、カラギーナン、ポリウレタン、ポリ-2-ヒドロキシエチルメタクリル酸、ポリビニルクロリド、 γ -メチルポリグルタミン酸、ポリビニルピロリドン、ポリジメチルアクリルアミド、光架橋性樹脂、ポリエチレンジリコール誘導体、ポリプロピレンジリコール誘導体、ポリブタジエン誘導体、コロジオン、ナイロン、ポリウレア、シリカゲル、シリコン誘導体、フェニルシロキサン、フィブリン、硝酸セルロース、炭化水素、リン脂質、リン酸カルシウムゲル、フェノキシアセチル化物、グルコマンナン等。

【0044】固定化担体の製造方法について述べると、該バクテリアセルロースが微生物によって產生されたままのゲル状である場合、このゲル状のものを乾燥させることによって得られる乾燥物である場合、あるいはゲル状のものを離解後乾燥させることによって得られる乾燥物の内纖維状の形態を保っていないものである場合には、担体素材を適当な溶媒で溶液としあるいは溶融状態とすることによって流動性を持たせてから、該バクテリアセルロースに含浸し、これをゲル化させれば固定化担体が得られる。ゲル化の方法は、担体素材によって千差万別であるが、例えば、アルギン酸ナトリウムの場合は混合後塩化カルシウム溶液に入れればよいし、寒天の場合は温度を下げればよい。

【0045】該バクテリアセルロースが離解された状態、あるいはこれを凍結乾燥や臨界点乾燥等の方法によって得られる纖維状の形態を残したままの乾燥状態の場合には、これら該バクテリアセルロースと担体素材とを、前記のような含浸とはことなり、通常の方法で混合を行なってからゲル化、重合又は成形することにより固定化担体が得られる。

【0046】固定化担体中の該バクテリアセルロースの濃度は0.01%~99%、好ましくは0.1~2%程度がよい。

【0047】以上のような方法で得られた固定化担体の形状は、反応の種類や方法に従って自由に選択可能である。例えば、カラムにつめたり、攪拌槽に入れたりする場合はじゅう玉状に加工すればよいし、必要に応じて棒状や膜状にしてもよい。離解した該バクテリアセルロースを担体素材と混合させてからゲル化、重合又は成形させることにより固定化担体を製造する場合には、従来と同様の方法で固定化担体を加工成形すればよい。

【0048】一方、微生物によって產生されたままのゲル状から直接固定化担体を製造する場合には、担体素材をゲル状該バクテリアセルロースに含浸させてからゲル化させればよい。所定の形に加工するには、ゲル状バクテリアセルロースを必要な形状に加工してから担体素材を含浸させても良いし、一方、固定化担体を製造してから必要な形状に加工しても良い。

【0049】本発明の固定化担体に固定化される活性成分は酵素、微生物、生体由来物質、触媒、その他の反応性物質であり、一般に用いられるものであればよい。活性成分の酵素例としては、アスパルターゼ、L-アスパルテート β -デカルボキシラーゼ、L-ロイシンデヒドロゲナーゼ、ヒダントイナーゼ、DL-2-アミノ- Δ^2 -チアゾリン-4-カルボン酸水解酵素、ジヒドロピリミジナーゼ、アシルアミノ酸に作用するアシラーゼ、トリプトファンセターゼ、チロシナーゼ、スマラーゼ、ヒスチジンアンモニアリーゼ、L-アミノ酸オキシダーゼ、 α -アミラーゼ、 β -アミラーゼ、インペルターゼ、グルコースイソマラーゼ、ベニシリニアシラーゼ、セファロスボリンアシラーゼ、5'-AMPデアミナーゼ、アルギニンデイミナーゼ、アルドラーゼ、システインデスルフヒドラーゼ、メチオニナーゼ、ホスホジエステラーゼ、キモトリプシン、トリプシン、パパイン、ナリンギナーゼ、ラクターゼ、グルコアミラーゼ、ロイシンアミノペプチダーゼ、ペプシン、アミノラクタムヒドロラーゼ、アミロラクタムラセマーゼ、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、アスパラギン酸デカルボキシラーゼ、プロラナーゼ、ヒアルロンダーゼ、1,4- α -グルカンホスホリラーゼ、シクロデキストリングリコシルトランスフェラーゼ、デキストランシュクラーゼ、 α -グルコシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、ヘキソキナーゼ、 Δ^1 -脱水素酵素、11 β -水酸化酵素、20 β -脱水素酵素、3 β -脱水素酵素、 Δ^1 -水酸化酵素、ステロイドのエステラーゼ、5'ホスホジエステラーゼ、ATPデアミナーゼ、酢酸キナーゼ、アデニル酸キナーゼ、アデノシンキナーゼ、カルバミルホスホキナーゼ、ピルビン酸キナーゼ、解糖系酵素キモシン、アルカリプロテアーゼ、レンニン、プロナーゼ、プロテアーゼ、カタラーゼ、リゾチーム、D-オキシニトラーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、硝酸レダクターゼ、亜硝酸レダクターゼ、ロダネーズ、グルタミナーゼ、

ゼ、ウリカーゼ、ペルオキシダーゼ、リバーゼ、コレステロールオキシダーゼ、ペニシリナーゼ、アルカリホスファターゼ、酸性ホスファターゼ、アセチルコリンエストラーゼ、等が挙げられる。活性成分の微生物例としては、ブレビバクテリウム・アンモニアゲネス、エシェリヒア・コリ、エルビヘルピコーラ、ストレプトコッカス・フェカーリス、シュードモナス・プチダ、セラチア・マセランス、バチルス・ズブチルス、アセトバクター・アセチ、ラクトバチルス・デルブレッティ、シュードモナス・フルオレッセンス、ミクロコッカス・ルテウス、バチルス・メガテリウム、ペニシリウム・クロリゲナム、カンジダ・トロピカリス、サッカロマイセス・セルビシエ等が挙げられる。そのほか、必要に応じて動物細胞、植物細胞等を固定化してもよい。

【0050】このようにして得られた固定化物は微生物や酵素を用いた医薬、食品等の有用物質の生産に利用できる。又、分析及び工業生産工程におけるバイオリアクターとしても利用できる。

【0051】又、触媒及びその他の反応性物質は該バクテリアセルロースと共存できかつ通常の化学反応等に用いられる有機及び無機物質であればよい。これらのものはカラムに充填し、反応床として使用することもできるし、各種クロマトグラフィにも利用できる。一方、粒径、サイズを選択することにより、物理的に目的物質を分離選択又は精製することに固定化担体を用いることができる。

【0052】

【作用】バクテリアセルロースはリボン状ミクロフィブリルからなっており、引張り強度、耐伸縮性、弾性などの力学強度が大きい。この力学強度は各ミクロフィブリルがからみ合うことによって高まり、配向性を付与することによって当該方向への強度がさらに高まる。バクテリアセルロースはプレスによって配向しやすいという性質をもっている。

【0053】

【実施例】

実施例1

シュクロース5 g/dl、酵母エキス(Difco)0.5 g/dl、硫安0.5 g/dl、 KH_2PO_4 0.3 g/dl、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05 g/dl(pH 5.0)の組成の培地50 mlを200 ml容三角フラスコに張込み、120°Cで20分間蒸気殺菌した。これに酵母エキス0.5 g/dl、ペプトン0.3 g/dl、マンニトール2.5 g/dl(pH 6.0)の組成の試験管斜面寒天培地で生育させた(30°C、3日間)アセトバクター、アセチ、サブスピーチ、キシリナムATCC 10821を1白金耳づつ接種し30°Cで培養した。30日後、培養液の上層に白色のバクテリアセルロース性多糖を含むゲル状の膜が形成された。

【0054】こうして得られたゲル状膜を水洗して約1

cmの厚さに広げ、テストプレス機(テスター産業(株))を用いて10 kg/cm²程度の圧力でプレスして水分を絞り出した。これをガラス板に貼り付けて105°Cで2時間乾燥し、厚さ約10 μmのシートを得た。

【0055】得られたシートのX線回折図を第1図に示す。この図は、シート面に対して平行の回転軸をとり、シートを回転させつつX線を回転軸に対して直角に入射させて撮影した回折像である。同図に示すように、

(イ) 101面、(ロ) 101面及び(ハ) 002面のいずれも配向しており、このシートは極めて高度の面配向をしているものであった。

【0056】このシート及び既存のセルロース性シートさらには各種高分子2次元材料について、弾性率を引張試験機を用いて測定した結果を下表に示す。

【0057】

【表1】

	シート	弾性率
本発明品	15.8 GPa	
セロファン	1.5	
セルロイド	2.0	
Nomex*	7.0	
ルミラー**	4.9	

*1 ポリメタフェニレンイソフタールアミドのシート

*2 二軸延伸ポリエチレンテレフタレートシート

【0058】実施例2

実施例1で使用したものと同じゲル状のバクテリアセルロースをロールプレス機(吉田工業(株))を用いて一方に向かって延しつつ圧搾した。このものをやはりガラス板に貼り付けて105°Cで2時間乾燥し、シートを得た。

【0059】得られたシートのX線回折図を第2図に示す。この図は、シートを固定し、フィルム面に対してX線を垂直に入射させて撮影した回折像である。図中、矢印は圧延方向を示している。同図に示すように、(イ) 101面、(ロ) 101面及び002面の全てに配向が見出され、一軸配向性が明瞭である。また、面配向についても第1図とほぼ同様の配向性が認められた。

【0060】このシートの弾性率を実施例1と同様にして測定したところ圧延方向で20 GPaであった。

【0061】実施例3

ノボロイド繊維(郡栄化学工業製・商品名カイノール繊維KF0203, φ14 μm, 3 mm長)に対しバクテリアセルロースを添加し、坪量60 g/m²のシートをTAPPI法により抄紙した(TAPPI standard T205m-58)。

【0062】また、比較のため通常の木材パルプ(N.U.S.P)を高度に叩解したもの(CSF245 m1)とカイノール繊維との混抄紙も作製した。

11

【0063】これらのシートの裂断長を自記記録式引張試験機で測定した。結果は次表の如くになった。

【0064】

【表2】

	裂断長
カイノール95部B.C.	5部 0.33km
カイノール90部B.C.	10部 0.79km
カイノール80部B.C.	20部 1.87km
カイノール90部N.U.S.P	10部 0.12km

12

* 【0065】バクテリアセルロースの使用により、少量の添加で抄紙が可能となり、また強度も大となった。通常のパルプ使用の場合には、10部以下の使用では抄紙不能であった。

【0066】実施例4

種々の無機纖維を使用し、B.C.との混抄紙を作製し裂断長を測定した。結果は次表の通りであった。

【0067】

【表3】

* 10

カーボン繊維(東レ・トレカT008)3mm長 バクテリアセルロース	95部 5部	裂断長0.15km
カーボン繊維(東レ・トレカT008)6mm長 バクテリアセルロース	90部 10部	裂断長0.64km
アルミナ繊維(デンカ製アルセン・バルク) バクテリアセルロース	90部 5部	裂断長0.24km

【0068】いずれの場合にも5~10%の添加で抄紙が可能であった。

【0069】実施例5

ゲル状のバクテリアセルロースをプレス、乾燥しシートを得た。振動リード法により測定したヤング率Eは次の如くであった。

$$E = 13.6 \text{ GPa}$$

【0070】この値は木材パルプのみで作られた紙の通常のヤング率の5~10倍である。

【0071】実施例6

ゲル状のバクテリアセルロースをホモジナイザーにより離解し、TAPP I法により抄紙した、このものの振動リード法で測定したヤング率Eは、

$$E = 7.4 \text{ GPa}$$

【0072】また、沪水性を向上させ、微細粒子の歩留りを向上させる目的でポリアミドエピクロルヒドリン樹脂(ディック・ハーキュレス社製カイメン557H)5%(固形分比)を添加し、抄紙した。この紙のEは次の通りであった。

$$E = 8.1 \text{ GPa}$$

【0073】いずれの場合も高強度の紙が得られた。

【0074】実施例7

木材パルプ(N.U.K.P)(CSF 540m³)に対しバクテリアセルロース(B.C.)を加え、さらに硫酸バソ±5% (固形分比)を添加して抄紙した紙の特性は次の通りであった。

【0075】

【表4】

※ 20	N.U.K.P B.C.	100部 80部 20部	裂断長 3.69km 裂断長 4.81km $E = 1.38 \text{ GPa}$
	N.U.K.P B.C.	100部 80部 20部	$E = 2.16 \text{ GPa}$

【0076】B.C.の添加により紙強度が向上した。

【0077】実施例8

所定の培養で得られたゲル状のバクテリアセルロースを標準パルプ離解機で離解した後125meshのふるいで沪過して固型分含量約8.8%のペースト状の離解物を得た。これを以下の実験に使用した。

【0078】光架橋性ポリビニルアルコール(PVA)-SbQ(GH-17SbQ 10.5wt% 1.2mol 1% 東洋合成工業(株))と上記の離解物と水を暗室で下表の割合で混合した。

【0079】

【表5】

試料	(a)	(b)	(c)
1	21.0	6.0	7.5
2	21.0	1.8	11.7
3	21.0	0.6	12.9
4	21.0	0.1	13.5

(a) PVA-SbQ(GH-17SbQ 10.5wt% 1.2mol 1%)

(b) バクテリアセルロース離解物(乾燥重量換算)

(c) H₂O

【0080】上の表の混合物をアクリル板上にガラス棒で厚さ約0.7mmに流延した。これを一晩風乾後さらに40°C、30min風乾した。ここまで操作は暗室

50

13

中で行なった。これを30分間日光下で露光し架橋して、シートを得た。

【0081】上記のものを3×1cmのリボン状に切断し水中に入れ2hr膨潤試験を行なった。結果を下表に*

試 料	長さ×幅(cm)		長さ膨潤率 0 h → 2 h	重量×10 ² (g)		重量膨潤率 0 h → 2 h
	0 h	2 h		0 h	2 h	
1	3×1	3.2×1.1	1.07	2.46	4.87	1.98
2	3×1	3.3×1.1	1.10	1.18	2.56	2.17
3	3×1	3.3×1.1	1.10	1.43	3.34	2.36
4	3×1	4.0×1.3	1.33	1.02	2.63	2.50

*示す。

【0082】

【表6】

14

【0083】バクテリアセルロースを入れることにより、膨潤を阻止できた。

【0084】次はこのシートの引張試験を行なった。

【0085】

【表7】

試 料	引張弾性率(GPa)
1	1.61
2	1.71
3	1.32
4	1.01

【0086】バクテリアセルロースを入れることにより、弾性率を1.3~1.6倍に改善することが出来た。

【0087】実施例9

実施例8の表の組成の混合物を厚さ1mmのスライドガラスをスペーサーとして2枚のガラス板の間にサンドイッチ状にはさんだ。これをそのまま日光で30分間露光して架橋させ、湿潤状態のコンニャク状のゲルを得た。これを蒸留水中に入れ実施例8と同様に膨潤試験を行なった。結果を下表に示す。

【0088】

【表8】

	乾強度(g/d)	湿強度(g/d)	乾伸度(%)	湿伸度(%)
B.C.	5.4	4.6	8.1	12.3
L.B.KP	3.2	2.1	5.7	7.9

【0092】実施例11

銅粉(福田金属箔粉工業製φ10μm)と木材パルプ(N.U.KP)(CSF540ml)との混合物に離解したバクテリアセルロースを加え、TAPP I法により抄紙した。また、比較のために銅粉と木材パルプとの混

※	試 料	重 量(g) 0 h → 2 h	吸 水 比
	1	1.75	3.97
	2	0.90	3.95
	3	0.48	5.05
	4	1.74	40.3
			23.2 } *

20 *試料3, 4は膨潤することにより破壊された。

【0089】バクテリアセルロースを混入することにより、ゲルの膨潤と破壊が阻止された。

【0090】実施例10

乾燥したバクテリアセルロース3.5部にジメチルアセトアミド100部を加え、60分間還流攪拌した。次に、100℃に冷却して塩化リチウム10部を徐々に添加した後、室温で1昼夜攪拌してバクテリアセルロースを溶解した。この紡糸原液をテトラヒドロフラン凝固液、紡糸ドラフト1.5浴長80cmで紡糸し紡糸浴から出た糸条を50℃の水中で50%延伸してから乾燥した。得られた繊維の性質は下表に示したとおりである。また、比較のために木材パルプ(L.B.KP)についても同様に紡糸した。

【0091】

※ 【表9】

★抄紙も作成した。これらのシートについて自動記録式引張り試験機で物性を測定した。結果を次表に示す。

【0093】

【表10】

	伸 び (%)	強 度 kg/mm ²	弾 性 率 kg/mm ²
銅粉100部N.U.KP10部, BC5部	1.6	0.68	560
銅粉100部N.U.KP10部	1.6	0.29	310

15

【0094】バクテリアセルロースの使用により、銅粉の洩れがなく、また強度も大巾に向上した。通常のパルプの場合は銅粉の60%以上が洩れて流出した。

【0095】実施例12

木材パルプ(N.U.K.P)(CSF540m1)に対して離解したバクテリアセルロース(BC)を加え、TAPP法により抄紙した。この紙にフェノール樹脂を含浸させて風乾し熱プレス加工によりフェノール積層板を*

	伸び (%)	強度 kg/mm ²	弾性率 kg/mm ²
N.U.K.P95部, BC5部	5.2	808	4400
N.U.K.P100部	4.4	658	3300

【0098】バクテリアセルロースの使用によりフェノール積層板の強度が大巾に向上した。

【0099】実施例13

実施例1で使用したものと同じゲル状のバクテリアセルロースを150°C、5kg/cm²で5分間熱プレス(吉田工業(株))し、シートを得た。得られたシートにポリエチレンイミン処理したポリエチレンフィルムを320°Cでラミネートしラミネートフィルムを作製した。このラミネートフィルムを自動記録式引張り試験機により物性を測定した。その結果、弾性率が16.2GPaと通常のセロハンーポリエチレンラミネートフィルムの弾性率1.7GPaより大巾に向上したラミネートフィルムを得た。

【0100】実施例14

塗化ケイ素及び炭化ケイ素(タテホ化学製10μm長)に対して離解したバクテリアセルロース(BC)を加え、TAPP法により抄紙した。また、比較のために、木材パルプ(N.U.K.P)及びミクロフィブリセルロース(MFC:ダイセル化学製)との混抄についても同様に行った。得られたシートを自動試験式引張り試験機により物性を測定した。その結果を次表に示す。

【0101】

【表12】

	弾性率kg/mm ²
塗化ケイ素100部, BC5部	150
炭化ケイ素100部, BC3部	120
炭化ケイ素100部, BC10部	350
炭化ケイ素100部, N.U.K.P5部	80

【0102】バクテリアセルロースの使用により、塗化ケイ素及び炭化ケイ素の洩れがなくまた弾性率も大巾に向上した。通常のパルプの場合は塗化ケイ素及び炭化ケイ素の60%以上が洩れて流出しMFCの場合はその殆んどが洩れて出した。

【0103】実施例15

*作製した。

【0096】また、比較のために木材パルプのみによるフェノール積層板も同様に作製した。これらのフェノール積層板をダンベル1号型(JIS K-7113)に成型し、自動記録式引張り試験機により物性を測定した。結果を次表に示す。

【0097】

【表11】

※フマル酸2g/dl、リン酸二水素カリウム0.2g/dl、硫酸マンガン4水塩1mg/dl、硫酸マグネシウム7水塩1mg/dl、塩化カルシウム0.05g/dl、酵母エキス(Difco)1.0g/dl、ペプトン(Difco)1.0g/dlの組成の液体培地をアンモニアを用いてpH7.0に調整した。この培地を500ccの坂口フラスコに50mlずつ分注し、E.co 11 ATCC 11775を一白金耳ずつ接種して30°Cで24時間培養した。菌体を常法に従い遠心分離により回収した。さらに生理食塩水を用いて2回洗浄後、湿重量と同量の生理食塩水に懸濁した。

【0104】この菌体を以下の方法によりゼラチン+本セルロースで作った担体に固定化を試みた。固定化法としては、特開昭59-66886号公報に記載されているトランスクルタミナーゼによる固定化法を用いた。ゼラチン(宮城化学)、該バクテリアセルロースを離解した物を下記の表に示した組成にて混合した。この混合液にさらに菌体を濃度3.5%となるように混合してから、特開昭59-66886号公報に記載されている方法に従い、トランスクルタミナーゼをゼラチン1mgに対して0.1ユニット加え25°Cに1時間放置してゲル化させた。このゲルを5mm角のサイの目状に切断して反応液に添加してアスパルターゼの活性を調べた。反応液は、フマル酸20g/dl、1mM・MgSO₄・7H₂Oを含有する溶液をアンモニアを用いてpH8.5に調整して用いた。反応液全量に対して菌体濃度が0.5%となるように菌体固定化ゼラチングルを反応液に入れた。反応は1時間行ない、5分おきにアスパラギン酸濃度をニンヒドリンによる比色で定量して反応初速度を求めた。反応液中への漏出菌数は、反応開始後30分間経過した後にコロニーカウントにより求めた。結果を次表に示す。

【0105】

【表13】

*

17

18

ゼラチン濃度 (%)	補強材及添加濃度 (%)	漏出菌数 (cells/ml)
12.5	0	1.2×10^8
12.0	バクテリアセルロース 0.5	1.1×10^7
12.5	バクテリアセルロース 0.5	9.8×10^6
12.0	ポリエステル紗 0.5	1.4×10^8
12.5	ポリエステル紗 0.5	1.1×10^8

【0106】酵素活性は、反応初速度より求めた。な
お、酵素活性は、バクテリアセルロースを添加しない場
合の1回目を100とし相対値で表わした。又、反応 * 【表14】

ゼラチン濃度 (%)	補強材及添加濃度 (%)	アスパルターゼ相対活性	
		1回目	10回目
12.5	0	100	35
12.0	バクテリアセルロース 0.5	99	80
12.5	バクテリアセルロース 0.5	102	85
12.0	ポリエステル紗 0.5	103	37
12.5	ポリエステル紗 0.5	97	38

【0108】バクテリアセルロースを添加することによ
り菌体の漏出が防止された為、繰り返し使用後の活性の
維持が可能となった。

【0109】また、前記の表に示したものと同様のゼラ
チン及び補強材を添加したゼラチンの破壊強度を測定し
た。測定は、前述のゼラチン溶液を直径 22 cm の円筒
形のプラスチック容器の中でゲル化させた後に、レオメ
ーター（不動工業社、NRM 2002 J）にセットし 30
mm のアダプターを直接ゲルに侵入させたときの最大荷重を破壊強度として表わすことにより行なった。結果
を次表に示す。

【0110】

【表15】

ゼラチン濃度 (%)	補強材及添加濃度 (%)	破壊強度 (g)
12.5	0	90
12.5	バクテリアセルロース 0.5	145
12.5	バクテリアセルロース 0.5	194
12.0	ポリエステル紗 0.5	111
12.5	ポリエステル紗 0.5	128

※【0111】バクテリアセルロースは、従来の補強材よ
りも優れた補強効果が認められた。

【0112】実施例16

アルギン酸ゲルへの固定化は、アルギン酸ナトリウムと
バクテリアセルロースを下記の表に従い混合した。次に
常法に従い、0.1 M CaCl₂溶液に滴下してじゅず
玉状のゲルを得た。

【0113】反応条件等については実施例15の通りとし
て、アスパルターゼの反応を行なった。漏出菌数につい
ては、反応液を取りえずに30分たったところでコロ
ニー数により求めた。結果を次表に示す。

【0114】

【表16】

※

19

20

アルギン酸濃度 (%)	補強材及添加濃度 (%)	30分後漏出菌数 (cells / ml)	
1.5	0	2.1×10^8	
1.0	バクテリアセルロース 0.5	5.3×10^6	
1.5	バクテリアセルロース 0.5	1.5×10^8	
1.0	ポリエステル紗	0.5	1.9×10^8
1.5	ポリエステル紗	0.5	2.0×10^8

【0115】上記の反応液を15分ごとにとりかえて合計4回の固定化担体のくりかえし反応を行なった。酵素活性は、3分おきにアスパラギン酸の濃度を測定して初速度から求めた。結果を次表に示す。アスパルターゼ活性*

アスパラギン酸濃度 (%)	補強材及添加濃度 (%)	アスパルターゼ相対活性			
		1回目	2回目	3回目	4回目
1.5	0	100	85	32	20
1.0	バクテリアセルロース 0.5	101	92	79	60
1.5	バクテリアセルロース 0.5	97	90	87	85
1.0	ポリエステル紗	0.5	101	80	29
1.5	ポリエステル紗	0.5	98	89	39

【0117】バクテリアセルロースを補強材として添加した結果、菌体の漏出が防止されたために従来の固定化担体よりも本発明の高強度固定化担体の方がくり返し使用することが可能となった。

【0118】実施例17
光架橋性樹脂に以下に述べる方法でインペルターゼを固定化した。インペルターゼ1部とリン酸緩衝液(pH 6.0)2部を混合した後に光架橋性樹脂溶液(pH 6.0)20部を混合した。この混合液をガラス板上に流延してから1日間風乾後光照射を1時間行ない架橋硬化※30

補強材及添加濃度 (%)	破断応力 (N Pa)	弾性率 (G Pa)	インペルターゼ相対活性	
			1回目	10回目
0	25.1	0.95	100	98
バクテリアセルロース 5	32.0	1.53	100	99
ポリエステル紗 5	28.3	1.20	100	98

バクテリアセルロースの添加によって固定化酵素膜の強度である膜の破断応力、弾性率等の膜の物理特性が大きく改善された。このため酵素の固定化のための操作が容易となり該セルロース性物質を添加しない場合に比べて添加した場合は、操作に要する時間は3/4に短縮された。

【0121】

【発明の効果】本発明の高力学強度成形材料は引張強度、耐伸縮性、弾性等にすぐれている。特に圧搾後乾燥して得られたシートは弾性率が極めて高く、実施例品においては、現在知られている2次元材料のなかでは最も弾性率の高いポリメタフェニレンイソフタルアミドのシートの弾性率の2倍以上であった。

10* 性は該セルロース性物質を添加しない場合の1回目を100とした時の相対値で示した。

【0116】

【表17】

※させた。補強材は、最終濃度が5%となるように添加した。

【0119】この固定化膜を5×5mmの大きさに細断し、ショ糖4gの溶液50ml中で、40°C 24hr攪拌反応してショ糖の分解率をしらべた。反応は10回くりかえした。また破断応力、弾性率についても調べた。結果を次表に示す。

【0120】

【表18】

★【0122】従ってこの材料は高い強度が要求される複合プラスチックス用の強化材として、例えば船、航空機、自動車などのボディ材料として、配線基盤等として、あるいは記録紙などの高級紙、打楽器の振動板等として使用できる。

40 【0123】加えて、この材料は天然物であって人の皮膚に対して炎症を生じさせなく、かつ通気性に優れているのでバンリコー基材として優れている。

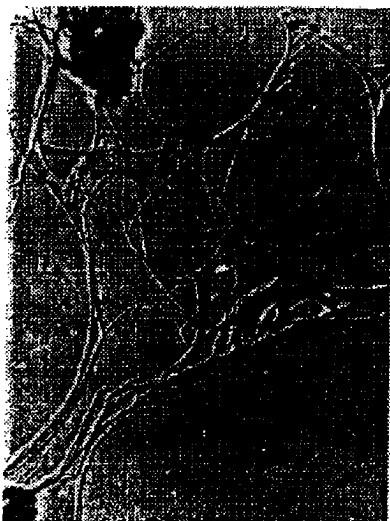
【0124】また、物理的な応力による破壊や変形に対して優れている上に溶液等によって引きおこされる膨潤による破壊や変形にも強い。したがって、固定化担体として使用した場合に激しい攪拌や、非常に長いカラムへの充填が可能となるばかりか、従来強度的に弱すぎて使

21

用不可能であるような担体も固定化担体として新たに使用可能となる。この固定化担体を製造する際には、従来の固定化担体の製造過程において度々生じた活性成分の凝集がなく従って、固定化担体内に活性成分を均一に分散させることが出来る。

【図面の簡単な説明】

【図1】



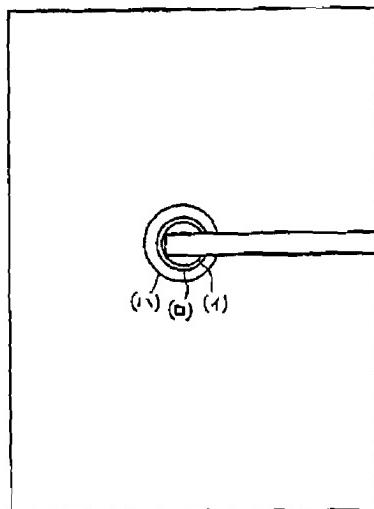
22

【図1】 アセトバクターアセティーサブスピーシキシリナムの生産するセルロース性物質の電子顕微鏡写真である。

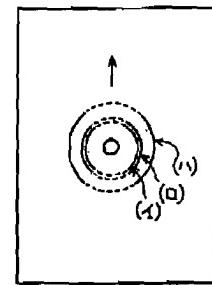
【図2】 本発明品のX線回折図形を示すものである。

【図3】 本発明品のX線回折図形を示すものである。

【図2】



【図3】



【手続補正書】

【提出日】 平成7年5月19日

【手続補正1】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 全文

【補正方法】 変更

【補正内容】

【書類名】 明細書

【発明の名称】 固定化担体補強材

【特許請求の範囲】

【請求項1】 リボン状ミクロフィブリルよりなるバクテリアセルロースよりなる固定化担体補強材

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明はバクテリアの產生する特定のセルロースよりなる固定化担体補強材に関するものである。

【0002】 この補強材を菌体、酵素等を固体担体に加えることによって固定化物の強度向上のほか、使用時の菌体漏出量を減少させることができる。

【0003】

【従来の技術】 固定化担体としては従来、寒天、カラギ

ーナンアルギン酸、ゼラチン、コラーゲン、ポリアミノ酸、光架橋性樹脂、ポリアクリルアミド及び各種樹脂等が用いられ、ポリ塩化ビニリデン、ポリエステル等の網、繊維を補強材としてこれらの担体に混合することにより、強度の向上とか粘着の紡糸がはかられてきた。

【0004】 また、バクテリアの產生するセルロースとしては、アセトバクター・キシリナム (*Acetobacter xylinum*) ATCC 23769が產生するシート状のものを医療用パッドに利用することが知られている（特開昭59-120159号公報）。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】 ところが、この固定化物においては、補強材により担体が大きくなつて単位面積当たりの表面積が減少し、担体内の基質拡散が阻害されたり、担体に固定化される酵素、生体由来物質、触媒、その他の反応性物質（以下「活性成分」という）の濃度が相対的に減少したりして反応速度や反応収率が低下するという問題があった。又、活性成分が固定化担体から漏出するために長期間あるいは繰り返し使用すると、次第に活性が低下していくという問題があり、従来のポリ塩化ビニリデン、ポリエステル等の補強材を加えて

も、活性成分の担体からの漏出を防ぐことは困難であった。従来の固定化担体の内、非常に弱いゲル、一例を挙げると光架橋性ポリビニルアルコールの6%水溶液を架橋させたものを固定化担体として用いる場合には、水によって膨潤が引き起こされる為に固定化担体が破壊されるという問題もあった。

【0006】バクテリアの產生するセルロースを利用したものとしては前述の例があるが、その利用は医療用パッドに限られており、高力学強度分野における素材として利用価値が高いことについては全く知られていなかった。

【0007】本発明の目的は強度の向上、粘着の防止、菌体等の漏出防止機能を有する酵素、微生物等の固定化担体に用いうる高強度成形材料を提供することにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者らはこれらの目的を達成するべく種々研究を行ない、微生物の產生するリボン状のミクロフィブリルよりなるセルロースが引張り強さ等の力学強度が極めて大きく、また、菌体の保持性等にもすぐれていてこのバクテリアセルロースを固定化担体補強材に用いることによって前記目的を達成しうることを見出し、この知見に基いて本発明を完成するに至った。

【0009】すなわち、本発明は、リボン状ミクロフィブリルよりなるバクテリアセルロースよりなる固定化担体補強材に関するものである。

【0010】バクテリアセルロースは、第1図にその電子顕微鏡写真を示すように、幅100~500Å、厚さ10~200Å程度のリボン状ミクロフィブリルからなっている。一般にはゲルの形で得られ、その含水率は95% (w/v) 以上である。

【0011】このセルロースはセルラーゼによって容易に分解され、グルコースを生成する。すなわち、本セルロースの0.1% (w/v) 懸濁液にセルラーゼ(EC 3.2.1.4) (天野製薬製) を0.5% (w/v) になるように溶かし、0.1M酢酸緩衝液中で30℃で24時間反応させた。その結果、本物質の一部が分解されることが観察され、上澄液をペーパークロマトグラフィーで展開したところグルコースのほかに少量のセロビオース、セロトリオース及びその他のセロオリゴ糖が検出された。このほかに少量のフラクトース、マンノース等が検出される場合もあった。

【0012】すなわち、本発明のバクテリアセルロースはセルロース及びセルロースを主鎖としたヘテロ多糖を含むもの及び β -1,3, β -1,2等のグルカンを含むものである。ヘテロ多糖の場合のセルロース以外の構成成分はマンノース、フラクトース、ガラクトース、キシロース、アラビノース、ラムノース、グルクロン酸等の六炭糖、五炭糖及び有機酸等である。なお、これ等の多糖が单一物質である場合もあるし、2種以上の多糖が水

素結合等により混在していてもよい。

【0013】バクテリアセルロースは上記のようなものであればいかなるものであっても使用可能である。

【0014】このようなバクテリアセルロースを產生する微生物は特に限定されないが、アセトバクター・アセチ・サブスピーシス・キシリナム (*Acetobacter aceti subsp. xylinum*) ATCC 10821あるいは同パストウリアヌス (*A. pastorianus*)、同ランセンス (*A. ranceus*)、サルシナ・ベントリクリ (*Sarcina ventriculi*)、バクテリウム・キシロイデス (*Bacterium xyloides*)、シュードモナス属細菌、アグロバクテリウム属細菌等でバクテリアセルロースを产生するものを利用することができる。

【0015】これらの微生物を培養してバクテリアセルロースを生成蓄積させる方法は細菌を培養する一般的方法に従えばよい。すなわち、炭素源、窒素源、無機塩類、その他必要に応じてアミノ酸、ビタミン等の有機微量栄養素を含有する通常の栄養培地に微生物を接種し、静置又はゆるやかに通気搅拌を行なう。炭素源としては、グルコース、シュクロース、マルトース、澱粉加水分解物、糖蜜等が利用されるが、エタノール、酢酸、クエン酸等も単独あるいは上記の糖と併用して利用することができる。窒素源としては、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム等のアンモニウム塩、硝酸塩、尿素、ペプトン等の有機あるいは無機の窒素源が利用される。無機塩類としては、リン酸塩、マグネシウム塩、カルシウム塩、鉄塩、マンガン塩等が利用される。有機微量栄養素としては、アミノ酸、ビタミン、脂肪酸、核酸、さらにはこれらの栄養素を含むペプトン、カゼミノ酸、酵母エキス、大豆蛋白加水分解物等が利用され、生育にアミノ酸等を要求する栄養要求性変異株を用いる場合には要求される栄養素をさらに補添する必要がある。

【0016】培養条件も通常でよく、pHを5ないし9そして温度を20ないし40℃に制御しつつ1ないし30日間培養すれば表層にバクテリアセルロースがゲル状に蓄積される。

【0017】本発明で使用するバクテリアセルロースは微生物の培養物から単離された精製品のほか、用途に応じある程度不純物を含むものであっても良い。例えば培養液中の残糖、塩類、酵母エキス等が微生物セルロースに残留していてもさしつかえない。また、菌体がある程度含まれていても良い。

【0018】このゲルを取り出して必要により、水洗する。この水洗水には目的に応じて殺菌剤、前処理剤などの薬剤を添加することができる。

【0019】これまでの固定化担体補強材に代えて、このバクテリアセルロースをそのままの状態や、離解し、あるいはこれらの物をさらして乾燥して用いることによ

り、従来にない高強度な固定化担体を得ることができ

る。

【0020】このような固定化担体を製造するには、次のような方法がある。基本的には、該バクテリアセルロースと、下記の固定化担体素材を混合してからゲル化、重合又は成形させればよい。又、必要に応じて、この混合時に固定化目的の活性成分を一緒に加えて固定化してもよいし、固定化担体を製造後活性成分を固定化してもよい。

【0021】担体素材としては、該バクテリアセルロースと混合可能なものであれば特に限定されないが、例えば以下のようなものを利用できる。アガロース、デキストラン、セルロース、セルロース誘導体、アルギン酸、アルギン酸塩、キチン、キトサン、コラーゲン、アルブミン、アミノ酸ポリマー、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、タンニン、シリコンゴム、カゼイン、寒天、カラギーナン、ポリウレタン、ポリ-2-ヒドロキシエカルメタクリル酸、ポリビニルクロリド、 γ -メチルポリグルタミン酸、ポリビニルピロリドン、ポリジメチルアクリルアミド、光架橋性樹脂、ポリエチレングリコール誘導体、ポリプロピレングリコール誘導体、ポリブタジエン誘導体、コロジオン、ナイロン、ポリウレア、シリカゲル、シリコン誘導体、フェニルシロキサン、フィブリン、硝酸セルロース、炭化水素、リン脂質、リン酸カルシウムゲル、フェノキシアセチル化物、グルコマンナン等。

【0022】また、光架橋性ポリビニルアルコールは従来の光架橋性樹脂と比較して生物に対する親和性がよいといわれており、酵素、微生物等の固定化剤の用途がこれによりさらに向上すると考えられている。しかし、この場合に水によって光架橋性ポリビニルアルコールが膨潤し架橋構造が破壊されてしまうという問題があった。しかるにバクテリアセルロースを加えることによってこの膨潤を阻止することができる。

【0023】固定化担体の製造方法について述べると、該バクテリアセルロースが微生物によって産生されたままのゲル状である場合、このゲル状のものを乾燥することによって得られる乾燥物である場合、あるいはゲル状のものを離解後乾燥させることによって得られる乾燥物の内纖維状の形態を保っていないものである場合には、担体素材を適当な溶媒で溶液とあるいは溶融状態とすることによって流動性を持たせてから、該バクテリアセルロースに含浸し、これをゲル化させれば固定化担体が得られる。ゲル化の方法は、担体素材によって千差万別であるが、例えば、アルギン酸ナトリウムの場合は混合後塩化カルシウム溶液に入れればよいし、寒天の場合は温度を下げればよい。

【0024】該バクテリアセルロースが離解された状態、あるいはこれを凍結乾燥や臨界点乾燥等の方法によつて得られる纖維状の形態を残したままの乾燥状態の場

合には、これら該バクテリアセルロースと担体素材とを、前記のような含浸とはことなり、通常の方法で混合を行なってからゲル化、重合又は成形することにより固定化担体が得られる。

【0025】固定化担体中の該バクテリアセルロースの濃度は0.01%~9.9%、好ましくは0.1~2%程度がよい。

【0026】以上のような方法で得られた固定化担体の形状は、反応の種類や方法に従つて自由に選択可能である。例えば、カラムにつめたり、攪拌槽に入れたりする場合はじゅう玉状に加工すればよいし、必要に応じて棒状や膜状にてもよい。離解した該バクテリアセルロースを担体素材と混合させてからゲル化、重合又は成形させることにより固定化担体を製造する場合には、従来と同様の方法で固定化担体を加工成形すればよい。

【0027】一方、微生物によって産生されたままのゲル状から直接固定化担体を製造する場合には、担体素材をゲル状該バクテリアセルロースに含浸させてからゲル化させればよい。所定の形に加工するには、ゲル状バクテリアセルロースを必要な形状に加工してから担体素材を含浸させても良いし、一方、固定化担体を製造してから必要な形状に加工しても良い。

【0028】本発明の固定化担体に固定化される活性成分は酵素、微生物、生体由来物質、触媒、その他の反応性物質であり、一般に用いられるものであればよい。活性成分の酵素例としては、アスパルターゼ、L-アスパルテート β -デカルボキシラーゼ、L-ロイシンデヒドロゲナーゼ、ヒダントイナーゼ、DL-2-アミノ- Δ^2 -チアゾリン-4-カルボン酸水解酵素、ジヒドロピリミジナーゼ、アシルアミノ酸に作用するアシラーゼ、トリプトファナーゼ、トリプトファンシンセターゼ、チロシナーゼ、スマラーゼ、ヒスチジンアンモニアリーゼ、L-アミノ酸オキシダーゼ、 α -アミラーゼ、 β -アミラーゼ、インペルターゼ、グルコースイソメラーゼ、ペニシリナーザ、セファロスボリンアシラーゼ、5'-AMPデアミナーゼ、アルギニンデイミナーゼ、アルドラーゼ、システインデスルフヒドラーーゼ、メチオニナーゼ、ホスホジエステラーゼ、キモトリップシン、トリプシン、パパイン、ナリンギナーゼ、ラクターゼ、グルコアミラーゼ、ロイシンアミノペプチダーゼ、ペプシン、アミノラクタムヒドロラーゼ、アミロラクタムラセマーゼ、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、アスパラギン酸デカルボキシラーゼ、ブルラーゼ、ヒアルロンダーゼ、1,4- α -グルカンホスホリラーゼ、シクロデキストリングリコシルトランスフェラーゼ、デキストランシュクラーゼ、 α -グルコシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、ヘキソキナーゼ、 Δ^1 -脱水素酵素、1,1 β -水酸化酵素、2,0 β -脱水素酵素、3 β -脱水素酵素、 Δ^1 -水酸化酵素、ステロイドのエステラーゼ、5'ホスホジエステラーゼ、ATPデアミナーゼ、酢酸

キナーゼ、アデニル酸キナーゼ、アデノシンキナーゼ、カルバミルホスホキナーゼ、ビルビン酸キナーゼ、解糖系酵素キモシン、アルカリプロテアーゼ、レンニン、プロナーゼ、プロテアーゼ、カタラーゼ、リゾチーム、D-オキシニトラーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、硝酸レダクターゼ、亜硝酸レダクターゼ、ログネーズ、グルタミナーゼ、ウリカーゼ、ペルオキシダーゼ、リパーゼ、コレステロールオキシダーゼ、ペニシリナーゼ、アルカリホスファターゼ、酸性ホスファターゼ、アセチルコリンエストラーゼ、等が挙げられる。活性成分の微生物例としては、ブレビバクテリウム・アンモニアゲネス、エシェリヒア・コリ、エルビヘルビコーラ、ストレプトコッカス・フェカーリス、シュードモナス・プチダ、セラチア・マセランス、バチルス・ズブチルス、アセトバクター・アセチ、ラクトバチルス・デルブレッティ、シュードモナス・フルオレッセンス、ミクロコッカス・ルテウス、バチルス・メガテリウム、ペニシリウム・クロリゲナム、カンジダ・トロピカリス、サッカロマイセス・セルビシエ等が挙げられる。そのほか、必要に応じて動物細胞、植物細胞等を固定化してもよい。

【0029】このようにして得られた固定化物は微生物や酵素を用いた医薬、食品等の有用物質の生産に利用できる。又、分析及び工業生産工程におけるバイオリアクターとしても利用できる。

【0030】又、触媒及びその他の反応性物質は該バクテリアセルロースと共存できかつ通常の化学反応等に用いられる有機及び無機物質であればよい。これらのものはカラムに充填し、反応床として使用することもできるし、各種クロマトグラフィにも利用できる。一方、粒径、サイズを選択することにより、物理的に目的物質を分離選択又は精製することに固定化担体を用いることができる。

【0031】

【実施例】

実施例1

ショクロース5g/d1、酵母エキス(Difco)0.5g/d1、硫酸0.5g/d1、KH₂PO₄ 0.3g/d1、MgSO₄·7H₂O 0.05g/d1(pH 5.0)の組成の培地50mlを200ml容三角フラスコに張込み、120℃で20分間蒸気殺菌した。これに酵母エキス0.5g/d1、ペプトン0.3g/d1、マンニトール2.5g/d1(pH 6.0)の組成の試験管斜面寒天培地で生育させた(30℃、3日間)アセト

バクター、アセチ、サブスピーチ、キシリナムATCC 10821を1白金耳づつ接種し30℃で培養した。30日後、培養液の上層に白色のバクテリアセルロース性多糖を含むゲル状の膜が形成された。

【0032】こうして得られたゲル状のバクテリアセルロースを標準パラフ離解機で離解した後125meshのふるいで沪過して固型分含量約8.8%のペースト状の離解物を得た。これを以下の実験に使用した。

【0033】フマル酸2g/d1、リン酸二水素カリウム0.2g/d1、硫酸マンガン4水塩1mg/d1、硫酸マグネシウム7水塩1mg/d1、塩化カルシウム0.05g/d1、酵母エキス(Difco)1.0g/d1、ペプトン(Difco)1.0g/d1の組成の液体培地をアンモニアを用いてpH 7.0に調整した。この培地を500ccの坂口フラスコに50mlずつ分注し、E.coli ATCC 11775を1白金耳づつ接種して30℃で24時間培養した。菌体を常法に従い遠心分離により回収した。さらに生理食塩水を用いて2回洗浄後、湿重量と同量の生理食塩水に懸濁した。

【0034】この菌体を以下の方法によりゼラチン+本セルロースで作った担体に固定化を試みた。固定化法としては、特開昭59-66886号公報に記載されているトランスクルタミナーゼによる固定化法を用いた。ゼラチン(宮城化学)、該バクテリアセルロースを離解した物を下記の表に示した組成にて混合した。この混合液にさらに菌体を濃度3.5%となるように混合してから、特開昭59-66886号公報に記載されている方法に従い、トランスクルタミナーゼをゼラチン1mgに対して0.1ユニット加え25℃に1時間放置してゲル化させた。このゲルを5mm角のサイの目状に切断して反応液に添加してアスパラギン酸の活性を調べた。反応液は、フマル酸20g/d1、1mM·MgSO₄·7H₂Oを含有する溶液をアンモニアを用いてpH 8.5に調整して用いた。反応液全量に対して菌体濃度が0.5%となるように菌体固定化ゼラチングルを反応液に入れた。反応は1時間行ない、5分おきにアスパラギン酸濃度をニンヒドリンによる比色で定量して反応初速度を求めた。反応液中の漏出菌数は、反応開始後30分間経過した後にコロニーカウントにより求めた。結果を次表に示す。

【0035】

【表1】

ゼラチン濃度 (%)	補強材及添加濃度 (%)	漏出菌数 (cells/ml)
12.5	0	1.2×10^8
12.0	バクテリアセルロース 0.5	1.1×10^7
12.5	バクテリアセルロース 0.5	9.8×10^6
12.0	ポリエスチル紗 0.5	1.4×10^8
12.5	ポリエスチル紗 0.5	1.1×10^8

【0036】酵素活性は、反応初速度より求めた。なお、酵素活性は、バクテリアセルロースを添加しない場合の1回目を100とし相対値で表わした。又、反応は、10回くりかえした。結果を次に示す。

【0037】

【表2】

ゼラチン濃度 (%)	補強材及添加濃度 (%)	アスパルターゼ相対活性	
		1回目	10回目
12.5	0	100	35
12.0	バクテリアセルロース 0.5	99	80
12.5	バクテリアセルロース 0.5	102	85
12.0	ポリエスチル紗 0.5	103	37
12.5	ポリエスチル紗 0.5	97	38

【0038】バクテリアセルロースを添加することにより菌体の漏出が防止された為、繰り返し使用後の活性の維持が可能となった。

【0039】また、前記の表に示したものと同様のゼラチン及び補強材を添加したゼラチンの破壊強度を測定した。測定は、前述のゼラチン溶液を直徑2.2cmの円筒形のプラスチック容器の中でゲル化させた後に、レオメーター(不動工業社、NRM2002J)にセットし5mmφのアダプターを直接ゲルに侵入させたときの最大荷重を破壊強度として表わすことにより行なった。結果を次表に示す。

【0040】

【表3】

ゼラチン濃度 (%)	補強材及添加濃度 (%)	破壊強度 (g)
12.5	0	90
12.5	バクテリアセルロース 0.5	145
12.5	バクテリアセルロース 0.5	194
12.0	ポリエスチル紗 0.5	111
12.5	ポリエスチル紗 0.5	128

【0041】バクテリアセルロースは、従来の補強材よりも優れた補強効果が認められた。

【0042】実施例2

アルギン酸ゲルへの固定化は、アルギン酸ナトリウムとバクテリアセルロースを下記の表に従い混合した。次に常法に従い、0.1M CaCl₂溶液に滴下してじゅず玉状のゲルを得た。

【0043】反応条件等については実施例15の通りとして、アスパルターゼの反応を行なった。漏出菌数については、反応液を取り変えずに30分たったところでコロニー数により求めた。結果を次表に示す。

【0044】

【表4】

アルギン酸濃度 (%)	補強材及添加濃度 (%)	30分後漏出菌数 (cells / ml)
1.5	0	2.1×10^8
1.0	バクテリアセルロース 0.5	5.3×10^6
1.5	バクテリアセルロース 0.5	1.5×10^5
1.0	ポリエステル紗	0.5
1.5	ポリエステル紗	0.5

【0045】上記の反応液を15分ごとにとりかえて合計4回の固定化担体のくりかえし反応を行なった。酵素活性は、3分おきにアスパラギン酸の濃度を測定して初速度から求めた。結果を次表に示す。アスパルターゼ活性は該セルロース性物質を添加しない場合の1回目を1

アスパラギン酸 濃度 (%)	補強材及添加濃度 (%)	アスパルターゼ相対活性			
		1回目	2回目	3回目	4回目
1.5	0	100	85	32	20
1.0	バクテリアセルロース 0.5	101	92	79	60
1.5	バクテリアセルロース 0.5	97	90	87	85
1.0	ポリエステル紗	0.5	101	80	29
1.5	ポリエステル紗	0.5	98	89	39

【0047】バクテリアセルロースを補強材として添加した結果、菌体の漏出が防止されたために従来の固定化担体よりも本発明の高強度固定化担体の方がくり返し使用することが可能となった。

【0048】実施例3

光架橋性樹脂に以下に述べる方法でインペルターゼを固定化した。インペルターゼ1部とリン酸緩衝液(pH 6.0)2部を混合したものに光架橋性樹脂としてポリビニルアルコール(PVA)-SbQ(GH-17 Sb Q 10.5 wt% 1.2 mol%, 東洋合成工業(株))(pH 6.0)20部を混合した。この混合液をガラス

0とした時の相対値で示した。

【0046】

【表5】

板上に流延してから1日間風乾後光照射を1時間行ない架橋硬化させた。補強材は、最終濃度が5%となるように添加した。

【0049】この固定化膜を5×5mmの大きさに細断し、ショ糖4gの溶液50ml中で、40°C 24 hr攪拌反応してショ糖の分解率をしらべた。反応は10回くりかえした。また破断応力、弾性率についても調べた。結果を次表に示す。

【0050】

【表6】

補強材及添加濃度 (%)	破断応力 (N Pa)	弾性率 (G Pa)	インペルターゼ相対活性 1回目	10回目
0	25.1	0.95	100	98
バクテリアセルロース 5	32.0	1.53	100	99
ポリエステル紗 5	28.3	1.20	100	98

【0051】バクテリアセルロースの添加によって固定化酵素膜の強度である膜の破断応力、弾性率等の膜の物理特性が大きく改善された。このため酵素の固定化のための操作が容易となり該セルロース性物質を添加しない場合に比べて添加した場合は、操作に要する時間は3/4に短縮された。

【0052】

【発明の効果】本発明の補強材は物理的な応力による破壊や変形に対して優れている上に溶液等によって引き起こされる膨潤による破壊や変形にも強い。したがって、固定化担体に補強材として配合した場合に激しい攪拌

や、非常に長いカラムへの充填が可能となるばかりか、従来強度的に弱すぎて使用不可能であるような担体も固定化担体として新たに使用可能となる。この固定化担体を製造する際には、従来の固定化担体の製造過程において度々生じた活性成分の凝集がなく従って、固定化担体内に活性成分を均一に分散させることが出来る。

【図面の簡単な説明】

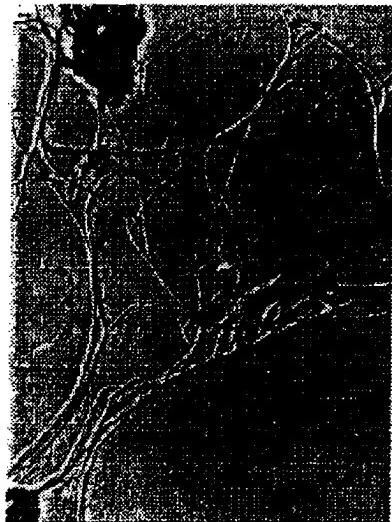
【図1】アセトバクターアセティーサブスピーシスキシリナムの生産するセルロース性物質の電子顕微鏡写真である。

【手続補正2】

【補正対象書類名】図面
【補正対象項目名】全図

【補正方法】変更
【補正内容】

【図1】



フロントページの続き

(51) Int.CI.⁶
H 01 B 3/48

識別記号

府内整理番号

F I

技術表示箇所

(72)発明者 三橋 重信
茨城県新治郡桜村吾妻2丁目709棟
(72)発明者 市村 国宏
茨城県筑波郡谷田部町松代5丁目630棟
(72)発明者 山中 茂
神奈川県横浜市南区大岡3-40-13

(72)発明者 渡部 乙比古
神奈川県川崎市川崎区観音2-20-8
(72)発明者 西 美緒
東京都品川区北品川6丁目7番35号 ソニ
ー株式会社内
(72)発明者 瓜生 勝
東京都品川区北品川6丁目7番35号 ソニ
ー株式会社内